

博士学位論文 2017（平成 29）年度

心臓発達及び心筋梗塞における血管形成を制御する

Flk1・Flt1 の時空間的な発現パターン解析

—心血管再生医療への応用—

慶應義塾大学大学院薬学研究科

黒津祥太

目次

第 1 章 背景

第 1 節 緒言

第 2 節 心臓の構造

第 3 節 VEGF シグナル

第 4 節 胎児期における冠血管発生

第 2 章 目的

第 3 章 材料・方法

第 1 節 研究倫理

第 2 節 遺伝子改変マウス

第 3 節 免疫染色

第 4 節 免疫組織学的解析

第 5 節 LacZ 染色

第 6 節 Azan 染色

第 7 節 心筋梗塞モデルマウス

第 8 節 統計学的解析

第 4 章 結果

第 1 節 出生後 1 日目の心臓における Flk1 の発現解析

第 2 節 出生後 1 日目の心臓における Flt1 の発現解析

第 3 節 出生後 1 日目及び成体の心臓における Flk1・Flt1 の発現解析

第 4 節 心筋梗塞後の心臓における Flk1・Flt1 の発現解析

第 5 章 考察

第 1 節 出生後の冠血管形成の最近の知見

第 2 節 出生後の冠血管形成メカニズムの仮説

第 3 節 心血管再生医療の現状

第 6 章 結論

謝辞

文献

第1章 背景

第1節 緒言

心臓は全身の血液循環を担う器官であり、大量の酸素と栄養を必要とする。したがって心臓発生過程において、心臓内には高度な血管網が形成される。心臓内の血管網は緻密にシステム化されており、一部の異常でさえ心機能が低下し、命の危険を伴う¹。このような心血管疾患は、心筋梗塞を引き起こし、世界的な医療上の問題となっている。WHOの報告によると、心筋梗塞をはじめとする虚血性心疾患による死者は全世界で年間800万人を超え、世界の死因の第一位である（2015年）（Fig. 1）。

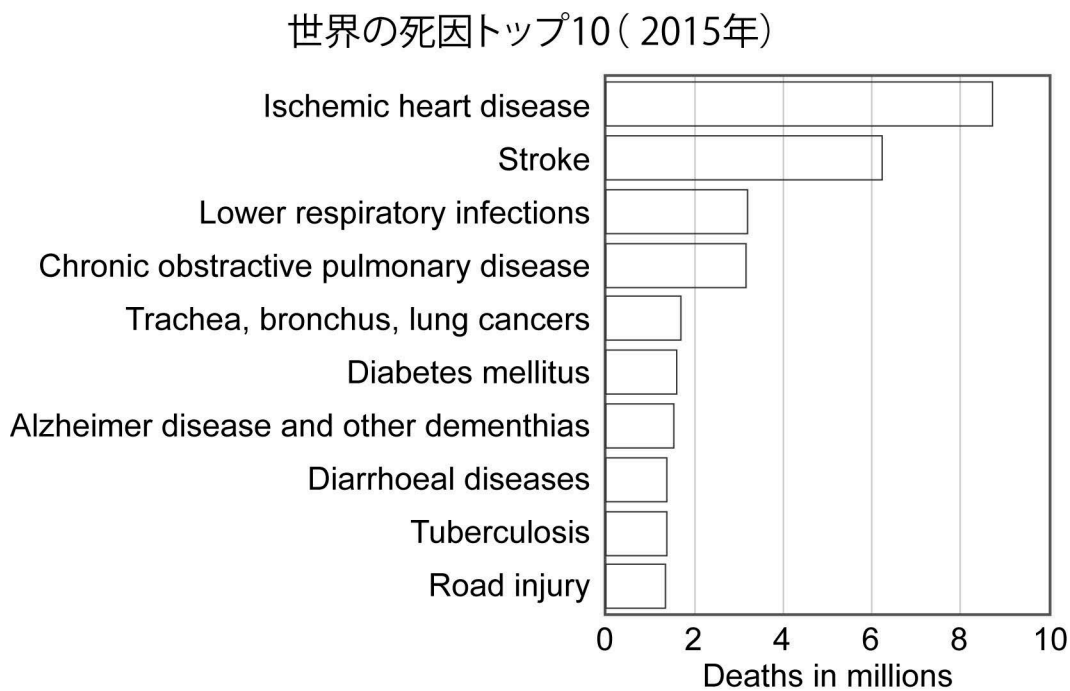


Fig. 1 世界の死因トップ10

世界の死因を示した。虚血性心疾患（876 万人）、脳卒中（624 万人）、下気道感染症（319 万人）、慢性閉塞性肺疾患（317 万人）、気管・気管支・肺がん（169 万人）、糖尿病（159 万人）、アルツハイマーその他認知症（154 万人）、下痢性疾患（139 万人）、結核（137 万人）、道路交通傷害（134 万人）。（出典：WHO ファクトシート 2015）

心筋梗塞を起こした患者には、早急な再灌流療法（Fig. 2）が求められるが、一度障害された心臓が機能を取り戻すことはない。心臓の機能を回復する治療法は、心臓移植術以外に実用化されておらず、新たな治療法の開発が求められている。新規治療法の開発には発生学や病理学的な観点から心血管を理解することが必要であるが、これまで胎児期における心血管発生メカニズムは示されているものの、出生後の心臓や心筋梗塞後の心臓における血管新生メカニズムは明らかにされていない。

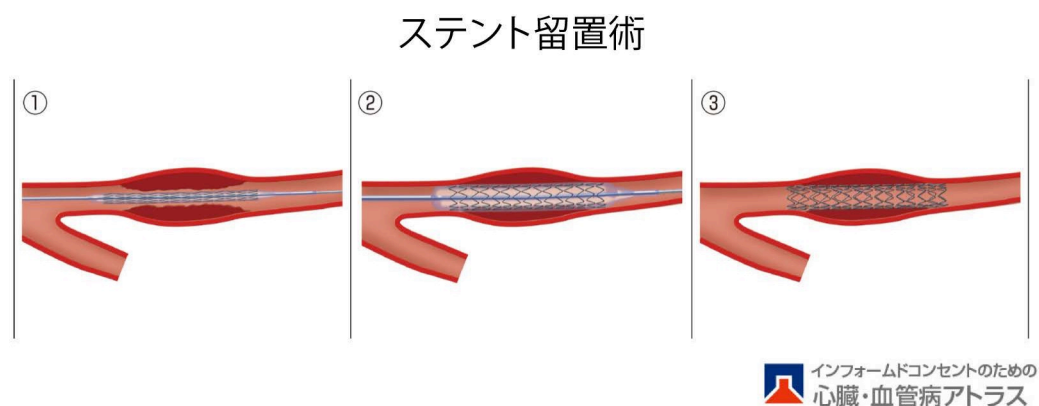


Fig. 2 ステント留置術

再灌流療法の一つであるステント留置術を示した。ステントは拡張することができる網目状の金属製の筒で、ステンレススチールやコバルト合金などの金属でできている。①小さなバルーンに取り付けたステントを疾患部位に挿入し、②動脈内で拡張し、③アテロームを血管壁に押しつけて血流を回復する。（出典：インフォームドコンセントのための心臓・血管病アトラス）

第 2 節 心臓の構造

心臓は左室、右室、左房、右房から構成され、それぞれが連携して機能することにより全身への血液供給を可能にする (Fig. 3)。心室壁は 3 層で構成され、外層は心外膜 (epicardium)、中層は心筋層 (myocardium)、内層は心内膜 (endocardium) と呼ばれる。さらに心外膜下には subepicardium と呼ばれる領域があり、心内膜は内皮と内膜下層 (subendocardium) に分かれる。心臓は様々な種類の細胞から構成されるが、心臓の機能を維持する上で特に心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞が重要である。心筋細胞は心臓のポンプ機能を担い、線維芽細胞は膠原線維を産生することで心臓全体の構造を維持する。また血管内皮細胞と血管平滑筋細胞は、血管を形成し、心臓内の血管網を構築する。

心臓の構造

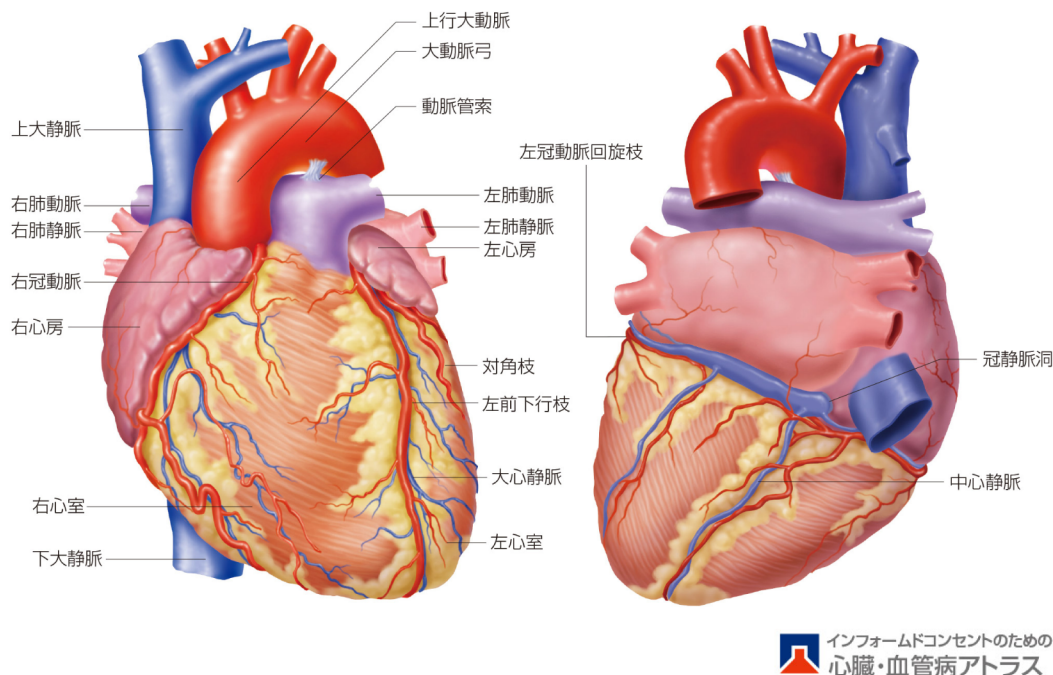


Fig. 3 心臓の構造

心臓の構造を示した。心臓は左室、右室、左房、右房から構成され、それぞれに大動脈、肺動脈、肺静脈、大静脈が接続している。冠動脈は上行大動脈の根元から発し、分岐しながら、心外膜下を心尖部に向かって走行する。(出典：インフォームドコンセントのための心臓・血管病アトラス)

心臓内の血管は冠血管と毛細血管に分類することができる。冠血管（動脈）は上行大動脈の根元から発し、分岐しながら、心外膜下を心尖部に向かって伸展する（Fig. 3）。分岐した冠血管は、心筋層へ貫入するとともに、さらに分岐を繰り返し、毛細血管網を形成する。冠血管は、内側から血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞からなる 3 層で構成され、血管収縮因子の働きにより血圧の調節が可能である（Fig. 4）²。一方、

毛細血管は血管内皮細胞の一層のみで形成されることで、血液と組織の間の物質交換を可能にする。

冠血管の構造

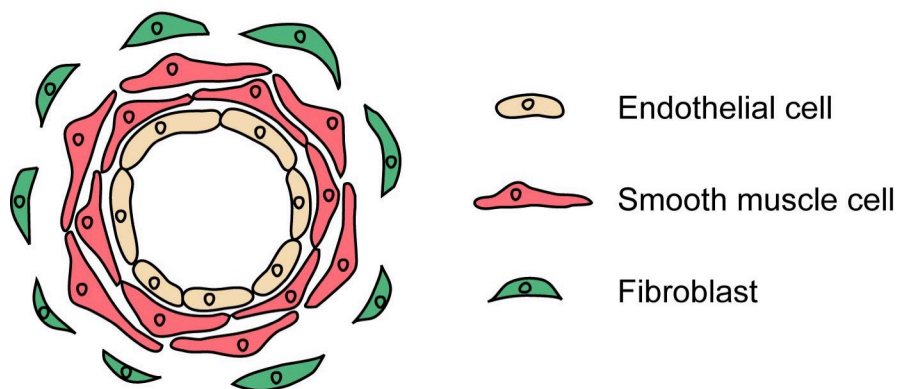


Fig. 4 冠血管の構造

冠血管の構造を示した。血管内皮細胞が最内側に単層構造を形成し、その周りを血管平滑筋細胞が覆う。線維芽細胞が最外層を形成し、血管の構造維持に寄与している。

第3節 VEGF シグナル

血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) は胎児期や心筋梗塞後に心筋層から産生され、血管内皮細胞の増殖、遊走、生存を司る³⁻⁷。血管新生に関する VEGF 受容体として、Flk1 (VEGF 受容体-2) と Flt1 (VEGF 受容体-1) が知られている。Flk1 は血管の出芽や分岐を引き起こすことで、血管形成を促進する一方、Flt1 は Flk1 の抑制因子として働くことで、血管形成を制御し、血管の機能を維持する⁸。発生過程における血管形成は、この Flk1 と Flt1 の双極性によって制御される (Fig. 5)。Flk1 欠損マウスでは血管新生が起きず、血管の形成不全によって embryonic day 8.5~10.5 (E8.5~10.5) で胎生致死となる⁹。一方、Flt1 欠損マウスでは Flk1 シグナルが過剰に活性化されることで、血管の過形成が起こり、E8.5~10.5 で胎生致死となる¹⁰。このように、VEGF シグナルにおける Flk1 と Flt1 のバランスが血管形成に重要であることが知られているが、免疫染色に適切な Flk1 と Flt1 の抗体がないため、これまで生体内における発現パターンは十分解明されていなかった。

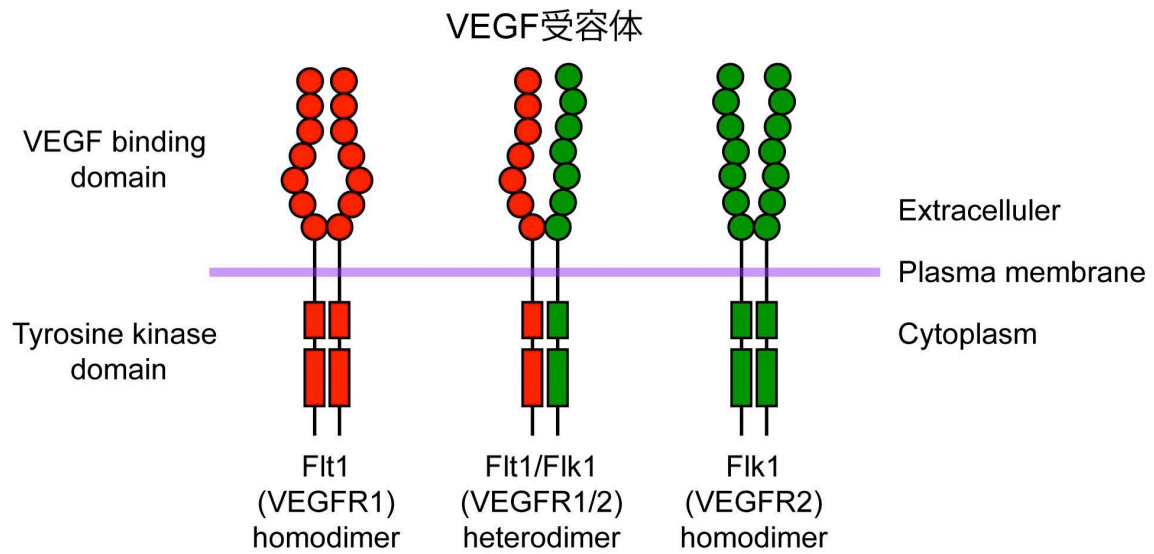


Fig. 5 VEGF 受容体

VEGF 受容体である Flk1 と Flt1 の構造を示した。Flt1 は VEGF に対して高い親和性を持つ一方、チロシンキナーゼ活性が低い。逆に、Flk1 は、Flt1 と比べ VEGF に対する親和性は低い、高いチロシンキナーゼ活性を持つ。Flk1 は血管内皮細胞を増殖、遊走させることで、血管新生を促進する。一方、Flt1 は、Flk1 の働きを抑制的に制御する。

第4節 胎児期における冠血管発生

心臓内の血管網は主に胎児期に形成され、出生後の心筋からの酸素要求に備える。マウスの心臓内の冠血管形成は E10.5 以降に急速に始まることが知られており、3つの起源が提唱されている (Fig. 6)^{6,7}。1つ目は、sinus venosus と呼ばれる、胎児期の全身血が心臓に入る前に通過する領域である。この領域の細胞が subepicardium 内を遊走し、冠血管を形成する¹¹。2つ目は、胎児期の心臓と肝臓の間に形成される proepicardial organ と呼ばれる領域である。この領域の細胞は、心臓の外層を遊走し、心外膜を形成するとともに、心筋層へ遊走、分化し、冠血管を形成する¹²。3つ目は、心臓の最も内側を構成する心内膜である。この細胞が血管内皮細胞へ転換し、心筋層へ遊走することで冠血管を形成する¹³。この3つの起源が心臓内の血管形成に寄与する割合は意見が分かれるが、左室と右室の間の中隔内の血管は、ほぼすべて心内膜由来であると考えられている。

胎児期における冠血管発生

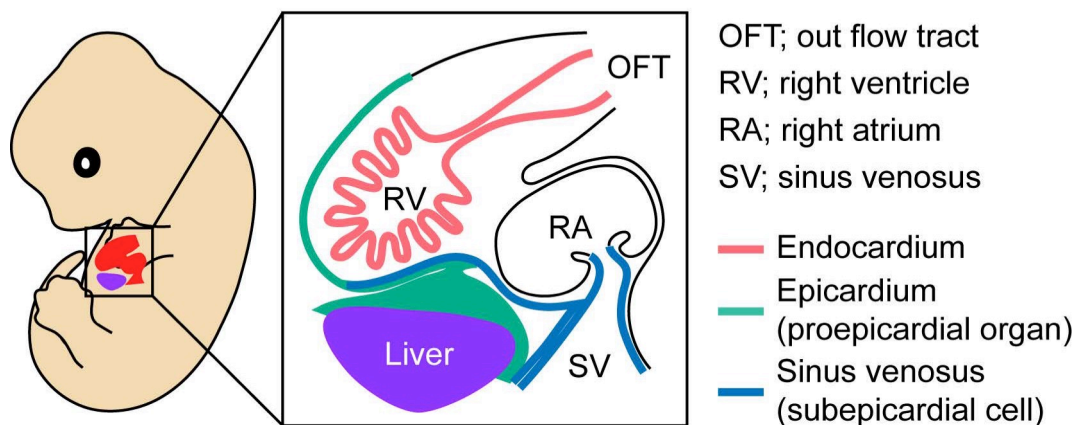


Fig. 6 胎児期における冠血管発生

胎児期における冠血管の発生過程を示した。心臓発生初期、全身の血液は右房に繋がる sinus venosus から流入し、右室に繋がる out flow tract を通って再び全身へ流出する。心臓と肝臓の間には、心外膜の起源となる proepicardial organ が存在する。これまでに endocardium と proepicardial organ、sinus venosus が、心臓内の血管内皮細胞の起源であると報告されている。

第2章 目的

心筋梗塞をはじめとする虚血性心疾患の治療法の開発が世界的に求められており、そのためには、発生学や病理学的な観点から冠血管形成のメカニズムを理解する必要がある。しかし、出生後の心臓や心筋梗塞後の心臓における血管形成の分子メカニズムは明らかにされていない。また VEGF シグナルは、全身の血管形成を司り、VEGF の欠損や、その受容体である Flk1 及び Flt1 の欠損は致死的事であることが知られているが、免疫染色に適切な Flk1 と Flt1 の抗体がないため、これまで生体内における発現解析は十分に行われてこなかった。そこで私は、最近開発された Flk1 と Flt1 のレポーターマウスを用いて^{14,15}、出生後の心臓の Flk1 と Flt1 の発現パターンを解析することで、冠血管形成のメカニズムを明らかにし、さらにこのマウスを用いて心筋梗塞モデルを作製することで、心筋梗塞後の冠血管再生を時空間的に解析することを目的として本研究を行った。

第3章 材料・方法

第1節 研究倫理

本研究における動物実験及び遺伝子組換え実験は、すべて慶應義塾大学動物実験委員会（承認番号：10252-(3)）、慶應義塾大学医学部 遺伝子組換え実験安全委員会（受付 No. 22-022-10）の承認を得て行った。

第2節 遺伝子改変マウス

Flk1-GFP bacterial artificial chromosome (BAC) トランスジェニックマウス及び Flt1-DsRed BAC トランスジェニックマウスは既述の通り作製され、滋賀医科大学動物生命科学研究センター・依馬正次教授よりご供与頂いた^{14,15}。Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスは Flk1-GFP BAC トランスジェニックマウスと Flt1-DsRed BAC トランスジェニックマウスを交配して作製した。Flk1-LacZ ノックインマウス（JAX#002938）は慶應義塾大学医学部・久保田義顕教授よりご供与頂いた。

第3節 免疫染色

摘出した心臓は、0.4%PFA で一晩固定した後、OCT compound (Sakura Finetek, CA、

USA、4583) を用いて包埋した。包埋した心臓を左室、右室、左房、右房が見えるように 7 μ m の厚さに薄切し、次の抗体を用いて染色した。一次抗体 : GFP (MBL、Aichi、Japan、598、Nacalai Tesque、Kyoto、Japan、04404-84)、RFP (Rockland immunochemicals、PA、USA、600-401-379)、cTnT (Thermo Scientific、MA、USA、MS-295-P1)、CD31 (BD Biosciences、CA、USA、550274)、 α SMA (Sigma、MO、USA、A2547)、Collagen 1 (Millipore、MA、USA、AB765P)。二次抗体 : Alexa Fluor 488、546 (Invitrogen、OR、USA)。核染色 : DAPI (Invitrogen、OR、USA、D21490)。染色した切片を、共焦点レーザー顕微鏡 LSM800 (Carl Zeiss、Oberkochen、Germany) を用いて撮影した。

第 4 節 免疫組織学的解析

陽性細胞数をカウントするために、心室壁を中央から二等分し、心外膜側と心内膜側の 2 つの領域を定義した。Flk1-GFP 陽性細胞と Flt1-DsRed 陽性細胞は心外膜側、心内膜側それぞれの領域から 1 切片あたり無作為に 3 ヶ所選び、その領域内の全核数に対する Flk1-GFP 陽性もしくは Flt1-DsRed 陽性細胞数の割合として算出した。冠血管における血管内皮細胞は、1 切片あたり無作為に 5 ヶ所選び、その中で冠血管を形成する血管内皮細胞数に対する Flk1-GFP 陽性もしくは Flt1-DsRed 陽性細胞数の割合として算出し

た。単位面積あたりの血管内皮細胞は、画像解析ソフトウェア Image J を用いて梗塞巣の面積を算出した後、梗塞巣内の Flk1-GFP 陽性もしくは Flt1-DsRed 陽性血管内皮細胞数をカウントすることで算出した。各群に対し 3 匹のマウスを用い、1 匹の心臓から 5 ～10 枚の切片を作製し、解析した。切片作製と細胞カウントをそれぞれ別の者が担当することにより、細胞カウントは盲検的に行った。

第 5 節 LacZ 染色

摘出した心臓を 0.2% グルタルアルデヒド/PBS で 3 時間固定した後、OCT compound を用いて包埋した。包埋した心臓を左室、右室、左房、右房が見えるように 7 μ m の厚さに薄切し、1 mg/mL X-gal 染色液（5 mM フェロシアン化カリウム、5 mM フェリシアン化カリウム、2 mM 塩化マグネシウム、0.02% Tween-20/PBS）中で一晩染色した。染色した切片を、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ710（Keyence、Osaka、Japan）を用いて撮影した。

第 6 節 Azan 染色

摘出した心臓を 4%PFA で一晩固定した後、パラフィンで包埋した。包埋した心臓を

左室、右室、左房、右房が見えるように 7 μm の厚さに薄切し、アゾカルミン G 浮遊液、5%リンモリブデン酸水溶液、アニリン青・オレンジ G 混合液を用いて順次染色した。染色した切片を、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ710 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて撮影した。

第 7 節 心筋梗塞モデルマウス

マウスの気道にサーフロー留置針を挿管し、人工呼吸器に接続した。イソフルラン麻酔下で開胸し、7-0 シルク縫合糸で左前下行枝を結紮することで心筋梗塞モデルを作製した。これまでに作製した心筋梗塞モデルマウスの生存率は 90%以上であった¹⁶。

第 8 節 統計学的解析

統計学的解析に用いたサンプル数 (n)、平均値、標準偏差、有意差は、figure 及び figure legend 内に記載した。検定はすべて、 $n \geq 3$ で行い、 $P < 0.05$ を有意と定義した。

第4章 結果

第1節 出生後1日目の心臓における Flk1 の発現解析

心臓における Flk1 の発現パターンを検討するために、出生後1日目の Flk1-GFP BAC トランスジェニックマウスの心臓を解析した。まず、Flk1-GFP BAC トランスジェニックマウスの心臓から左室、右室、左房、右房が見える四腔像の切片を作製し、心筋細胞のマーカーである cTnT と共免疫染することで、心臓全体における Flk1-GFP の発現パターンを解析した。その結果、Flk1 は、左室、右室、左房、右房のいずれにおいても発現することがわかったが、それぞれの部位で発現パターンに偏りがあった (Fig. 7)。

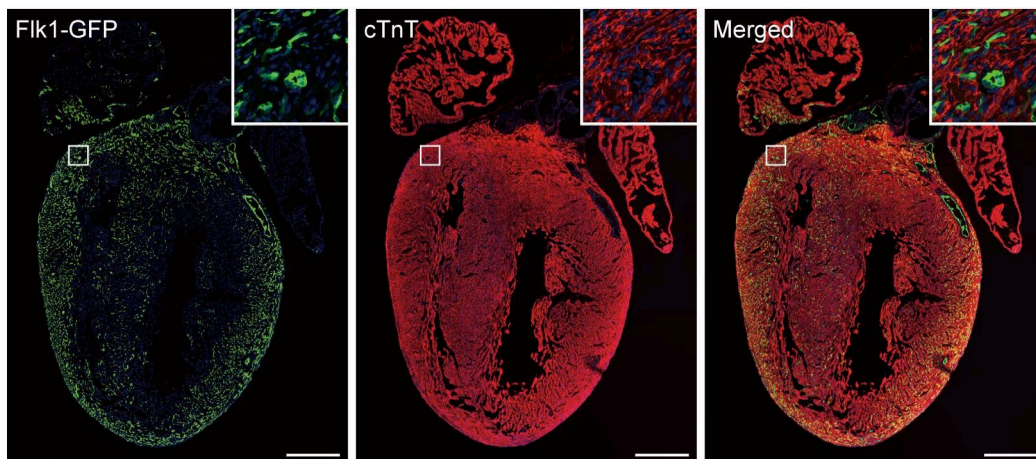


Fig. 7 出生後1日目の心臓における Flk1 の発現

Flk1-GFP、cTnT、DAPI で染色した出生後1日目の Flk1-GFP BAC トランスジェニックマウスの心臓の全体像を示した。右上の画像は白枠で示した部分の拡大像である。スケールバーは、500 μm を示している。

次に Flk1 を発現する細胞種を特定するために、心臓を構成する細胞種ごとに免疫組織学的に解析した。心臓を構成する細胞は主に心筋細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞の 4 種であり、それぞれに特異的なマーカー、cTnT（心筋細胞）、CD31（血管内皮細胞）、 α SMA（血管平滑筋細胞）、Collagen 1（線維芽細胞）に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、Flk1-GFP は CD31 陽性の冠血管及び毛細血管に発現することがわかった（Fig. 8）。一方、心筋細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞では Flk1-GFP の発現は認められなかった（Fig. 8）。

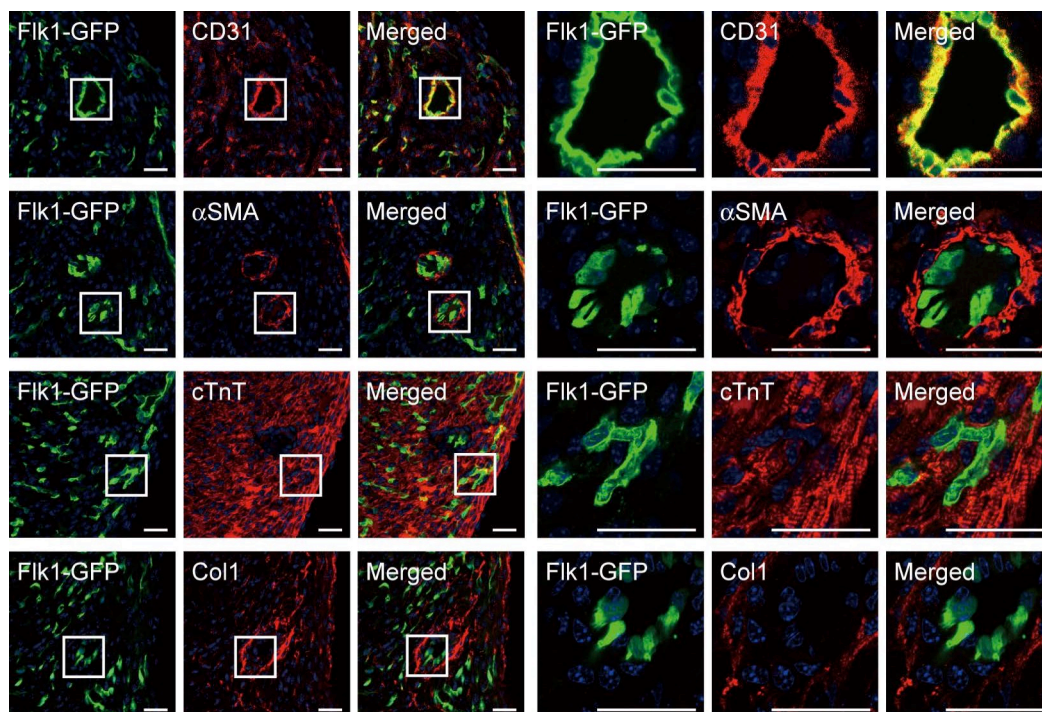


Fig. 8 出生後 1 日目の心臓における Flk1 の発現

Flk1-GFP、CD31、 α SMA、cTnT、collagen 1 (Col1)、DAPI で染色した出生後 1 日目の Flk1-GFP

BAC トランスジェニックマウスの心臓の一部（冠血管）を示した。右の 3 枚の画像は、左の 3 枚の画像の白枠で示した部分をそれぞれ拡大したものである。スケールバーは、30 μm を示している。Flk1-GFP は CD31 陽性の血管内皮細胞に発現した。

さらに私は、心室壁における Flk1 の発現パターンに着目した。心室壁を中央から二等分し、心外膜側と心内膜側それぞれの領域における Flk1-GFP 陽性細胞数をカウントしたところ、興味深いことに、心外膜側の Flk1-GFP 陽性血管内皮細胞は、心内膜側の約 2 倍多いことがわかった (Fig. 9A、B)。この特徴的な発現パターンは Flk1-LacZ ノックインマウスにおいても同様に確認された (Fig. 9A)。以上の結果から、Flk1 は左室、右室、左房、右房の血管内皮細胞に発現するが、心室においては心外膜側に優位に発現するという特徴的な発現パターンを見出した。

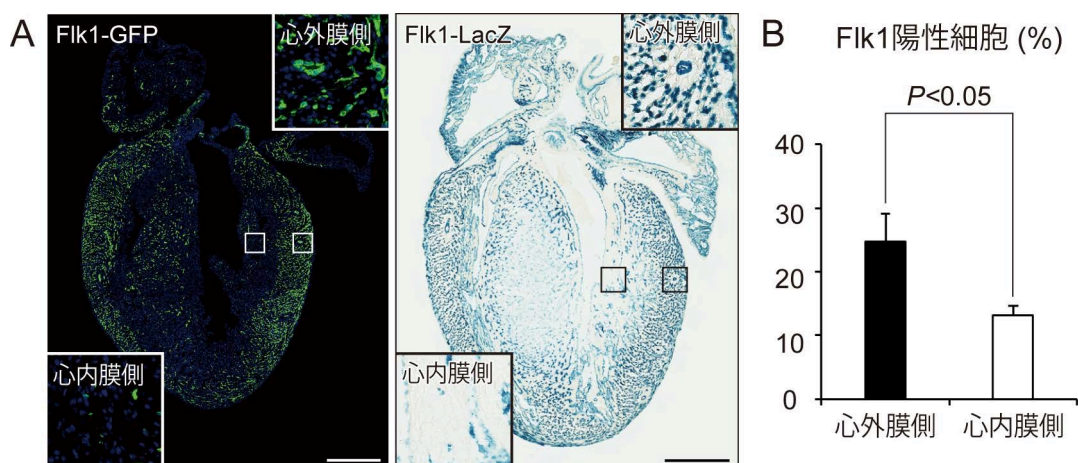


Fig. 9 出生後 1 日目の心臓における Flk1 の発現

(A) 出生後 1 日目の Flk1-GFP BAC トランスジェニックマウスと Flk1-LacZ ノックインマウス

の心臓の全体像を示した。右上及び左下の画像は、それぞれ白もしくは黒枠で示した心外膜側、心内膜側の領域の拡大像である。

(B) 心外膜側及び心内膜側における Fik1-GFP 陽性細胞の割合を示した ($n = 3$)。

データはすべて平均値 \pm 標準誤差で示し、スケールバーは、500 μm を示している。

第2節 出生後1日目の心臓における Flt1 の発現解析

次に、Flt1-DsRed BAC トランスジェニックマウスを用い、出生後1日目の心臓における Flt1 の発現パターンを解析した。まず、前節と同様に cTnT 抗体を用いて、心臓全体における Flt1 の発現パターンを解析した。その結果 Flt1-DsRed は Flk1-GFP とは異なり、心臓全体に偏りなく発現することがわかった (Fig. 10)。

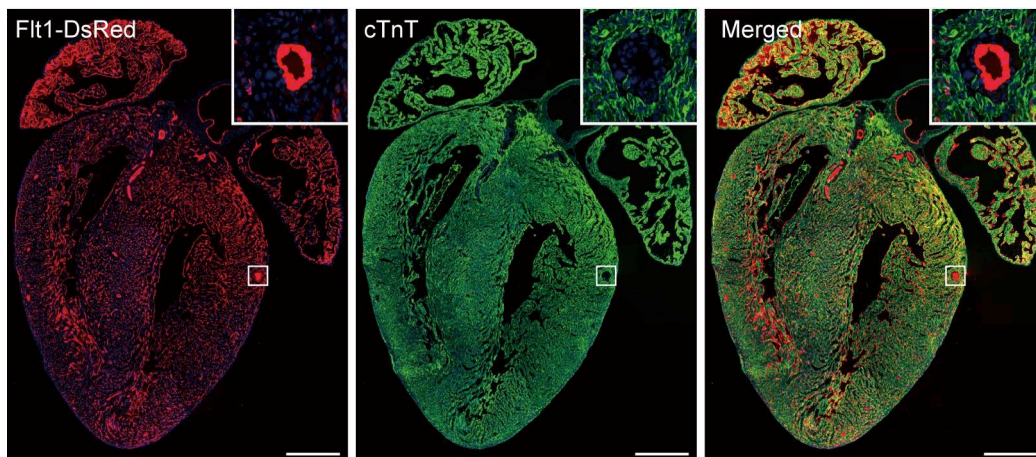


Fig. 10 出生後1日目の心臓における Flt1 の発現

Flt1-DsRed、cTnT、DAPI で染色した出生後1日目の Flt1-DsRed BAC トランスジェニックマウスの心臓の全体像を示した。右上の画像は白枠で示した部分の拡大像である。スケールバーは、500 μm を示している。

次に、心臓を構成する種々の細胞に対する抗体を用いて免疫組織学的に解析した結果、Flt1-DsRed は、Flk1-GFP と同様に CD31 陽性の血管内皮細胞のみで発現し、心筋細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞には発現しなかった (Fig. 11)。

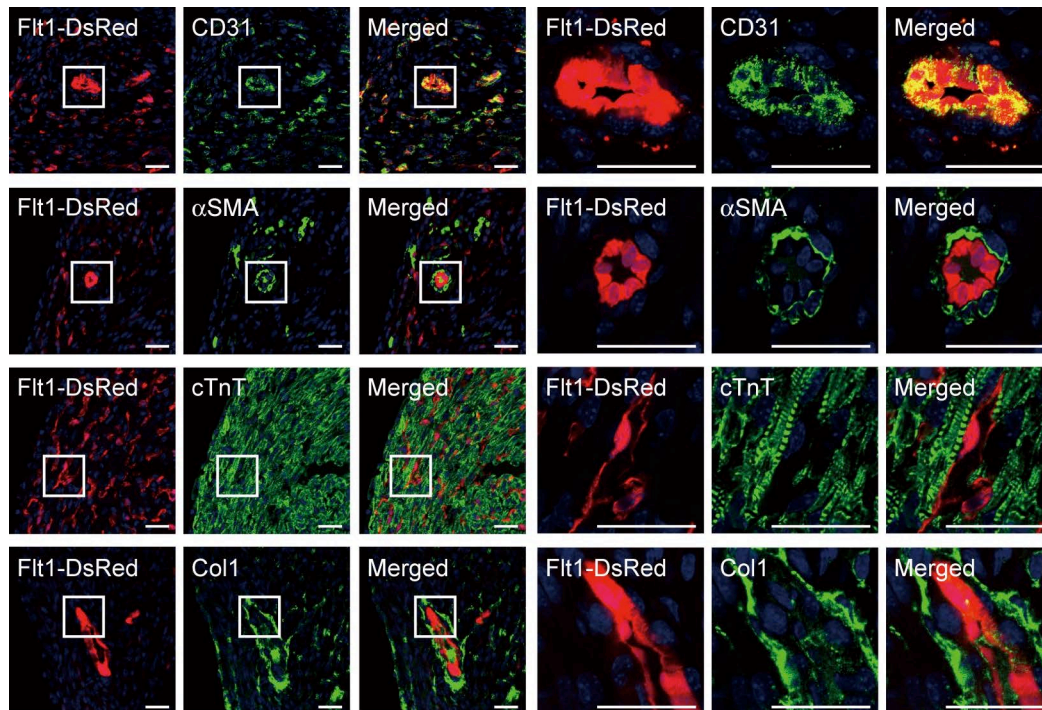


Fig. 11 出生後 1 日目の心臓における Flt1 の発現

Flt1-DsRed、CD31、 α SMA、cTnT、collagen 1 (Col1)、DAPI で染色した出生後 1 日目の Flt1-DsRed BAC トランスジェニックマウスの心臓の一部（冠血管）を示した。右の 3 枚の画像は、左の 3 枚の画像の白枠で示した部分をそれぞれ拡大したものである。スケールバーは、30 μ m を示している。Flt1-DsRed は CD31 陽性の血管内皮細胞に発現した。

さらに私は、心室壁を中央から二等分し、心外膜側と心内膜側それぞれの領域における Flt1-DsRed 陽性細胞数をカウントした。その結果、Flt1-DsRed 陽性血管内皮細胞は、心室壁において心外膜側と心内膜側に偏りなく、一様に分布することがわかった (Fig. 12A、B)。以上の結果から、Flt1 は心臓全体の冠血管及び毛細血管に一様に発現することがわかった。

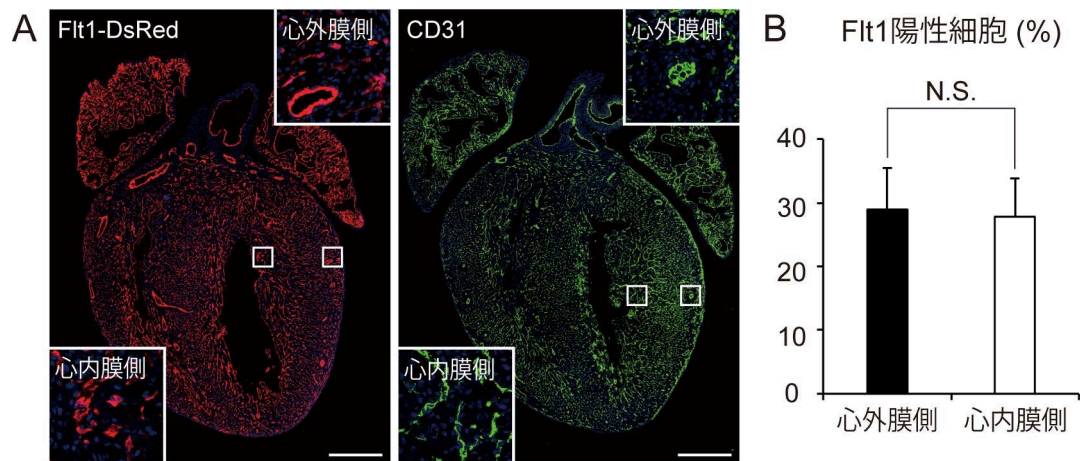


Fig. 12 出生後1日目の心臓におけるFlt1の発現

(A) 出生後1日目のFlt1-DsRed BACトランスジェニックマウスとCD31で染色した心臓の全体像を示した。右上及び左下の画像は、それぞれ白枠で示した心外膜側、心内膜側の領域の拡大像である。

(B) 心外膜側及び心内膜側におけるFlt1-DsRed陽性細胞の割合を示した ($n = 3$)。データはすべて平均値 \pm 標準誤差で示し、N.S.は有意差がないことを示している。スケールバーは、500 μm を示している。

第3節 出生後1日目及び成体の心臓における Flk1・Flt1 の発現解析

Flk1 と Flt1 の経時的な発現パターンを比較するために、Flk1-GFP BAC トランスジェニックマウスと Flt1-DsRed BAC トランスジェニックマウスを交配して、Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスを作製し、出生後1日目の心臓と出生後6～8週目（成体）の心臓を解析した。その結果、Flk1-GFP は心外膜側に優位に局在し、Flt1-DsRed は心臓全体に分布するという特徴的な発現パターンは成体においても維持されることがわかった（Fig. 13A、B）。

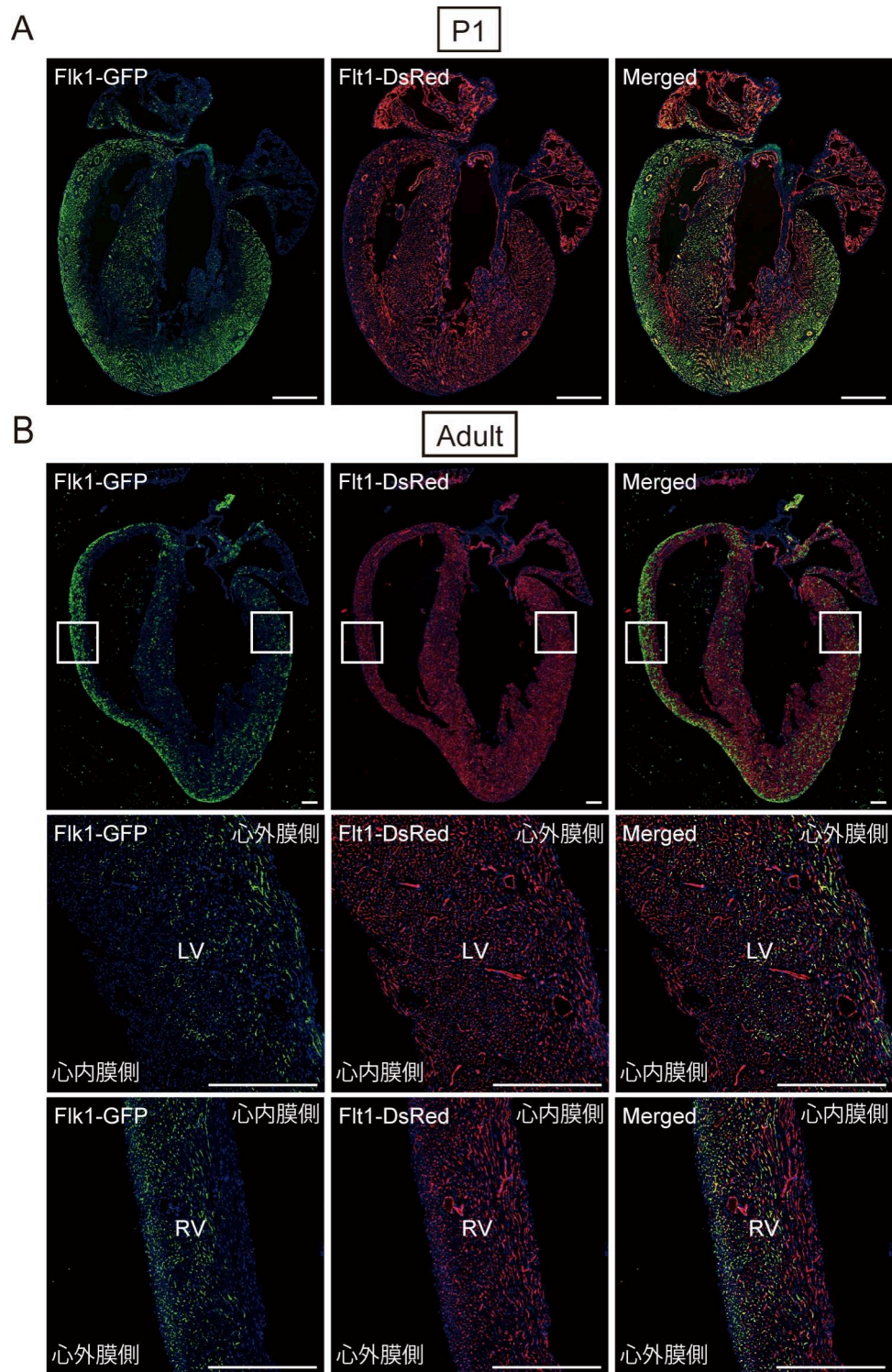


Fig. 13 出生後 1 日目 (P1) 及び成体の心臓における Flk1・Flt1 の発現

(A) 出生後 1 日目の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスの心臓の全体像を示した。Flt1 は心臓全体に発現する一方、Flk1 は心外膜側に優位に発現した。

(B) 成体の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスの心臓の全体像を示した。

下の 2 枚の画像は白枠で示した左心室壁及び右心室壁を拡大したものである。Flt1 は心臓全体に発現する一方、Flk1 は心外膜側に強く発現した。

LV : 左室、RV : 右室。スケールバーは、500 μ m を示している。

次に私は、冠血管に着目し、冠血管を構成する Flk1-GFP 陽性細胞と Flt1-DsRed 陽性細胞の割合を算出した。その結果、出生後 1 日目の心臓の冠血管では Flk1 と Flt1 は共に強く発現していたが (Fig. 14A、B)、成体の心臓の冠血管では Flk1 の発現が低下し、Flt1 のみが発現することがわかった (Fig. 14C、D)。

以上の結果から、Flt1 は血管の成熟度や心臓の部位を問わず発現する一方、Flk1 は幼若で血管新生の活発な冠血管のみで発現し、またその発現パターンは出生から成体となるまで心外膜側に優位であることがわかった。

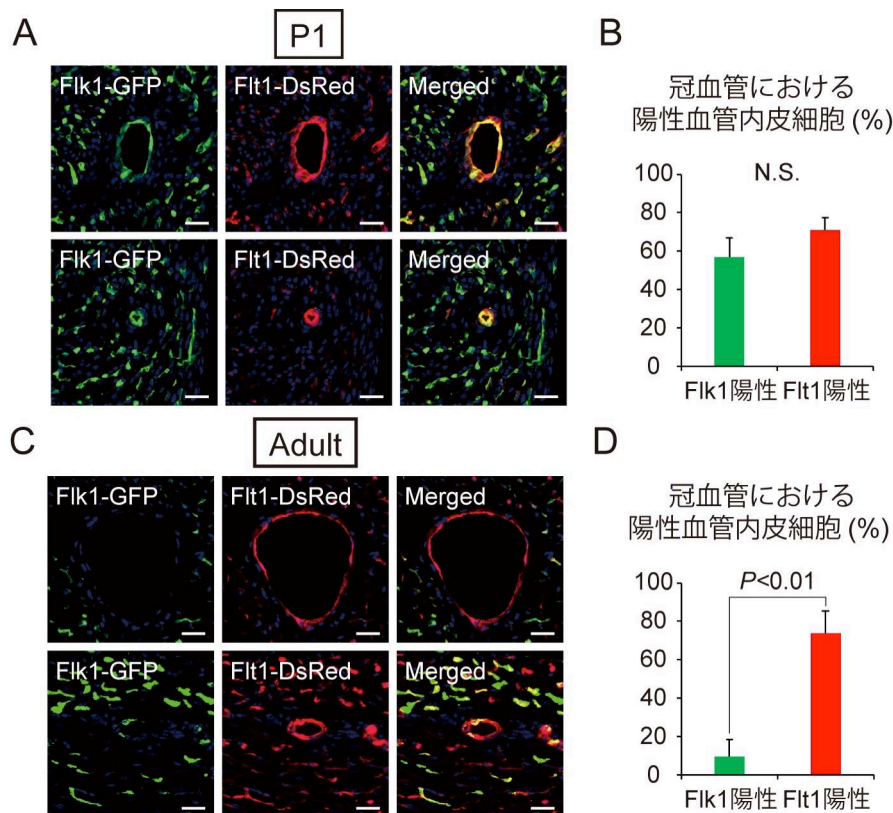


Fig. 14 出生後 1 日目 (P1) 及び成体の心臓における Flk1・Flt1 の発現

(A) 出生後 1 日目の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスの冠血管を示した。冠血管には Flk1 と Flt1 が強く発現していた。

(B) 出生後 1 日目の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスの冠血管における Flk1-GFP 陽性もしくは Flt1-DsRed 陽性細胞の割合を示した。冠血管において Flk1 と Flt1 は同じレベルで発現していた。

(C) 成体の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスの冠血管を示した。血管内皮細胞に Flt1 は発現したが、Flk1 はほとんど観察されなかった。

(D) 成体の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスの冠血管における Flk1-GFP 陽性もしくは Flt1-DsRed 陽性細胞の割合を示した。冠血管において Flk1 の発現のみ低下していた。

データはすべて平均値 \pm 標準誤差で示し、N.S.は有意差がないことを示している。スケールバーは、30 μ m を示している。

第4節 心筋梗塞後の心臓における Flk1・Flt1 の発現解析

前節では、出生後の心臓発達において Flk1 と Flt1 が時空間的に異なる発現パターンを示すことを見出した。本節では、疾患における血管再生プロセスと Flk1・Flt1 との関係を解析するために、出生後 6～8 週目の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスを用いて心筋梗塞モデルを作製し、心筋梗塞後 3 日目、7 日目、30 日目の心臓を経時的に解析した。心筋梗塞モデルは左前下行枝を結紮することで作製した。また Azan 染色を行うことで、心筋細胞を赤く、線維芽細胞（膠原線維）を青く染め分けた。心筋梗塞後 7 日目、梗塞巣では心筋細胞が壊死し、線維化が観察された (Fig. 15)。そこで私は、心筋梗塞後の梗塞巣における血管の壊死、及び血管再生を観察することにした。

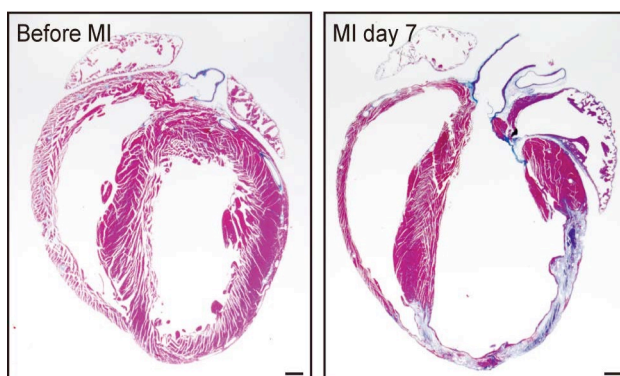


Fig. 15 心筋梗塞モデルの作製

Azan 染色した心筋梗塞前と心筋梗塞後 7 日目の心臓の全体像を示した。心筋梗塞後 7 日目、梗塞巣で線維化が観察された。MI：心筋梗塞。スケールバーは、500 μ m を示している。

心筋梗塞後 3 日目、結紮直下の心筋層では心筋細胞が壊死し、DAPI によって染色されない無細胞領域が観察された (Fig. 16、MI day 3)。一方、心外膜下及び心内膜下の一部では血管内皮細胞が生存していた (Fig. 16、MI day 3)。この領域で細胞が生存した理由として、心内膜側では心内腔から酸素が受動拡散し、心外膜側では隣接する心外膜側の冠血管から側副血行で酸素や栄養が補われた可能性が考えられる。心筋梗塞後 7 日目には、血管新生が起こり、毛細血管の増加と冠血管の形成を認めた (Fig. 16、MI day 7)。

興味深いことに、成体マウスであるにも関わらず、心筋梗塞後は Flk1 の発現が冠血管内皮に観察された (Fig. 16、MI day 7、Fig. 17、MI day 7)。さらに興味深いことに、Flk1 陽性の血管内皮細胞が心外膜側から梗塞巣へ遊走することが観察され、血管再生は心外膜側から起こることが示唆された (Fig. 16、MI day 7)。以上の結果は、心筋梗塞の急性期において、冠血管の Flk1 が再び活性化され、出生後に見られた心外膜側からの血管新生を再現したことを示している。その後、無細胞領域では線維芽細胞が増殖し、心筋梗塞後 30 日目には線維化巣が形成された (Fig. 16、MI day 30)。この時、血管内皮細胞における Flk1 の発現が低下しており、血管新生が終了したと考えられる。また、新生した毛細血管の多くは消失したが、残存した冠血管では Flt1 の発現が認められ、血管が成熟していた (Fig. 16 MI day 30、Fig. 17 MI day 30)。この結果から、心筋梗塞の慢性期

では冠血管における Flk1 の発現が低下し、Flt1 の発現のみが維持されることで、出生後から成体になるまでに観察された冠血管の成熟過程が心筋梗塞後に再現されることが示唆された。

以上の結果から、心筋梗塞の急性期では Flk1 が活性化され、慢性期では Flk1 の発現が低下し、Flt1 の発現のみが維持されることがわかり、冠血管再生過程は冠血管発生過程を再現することを明らかにした。

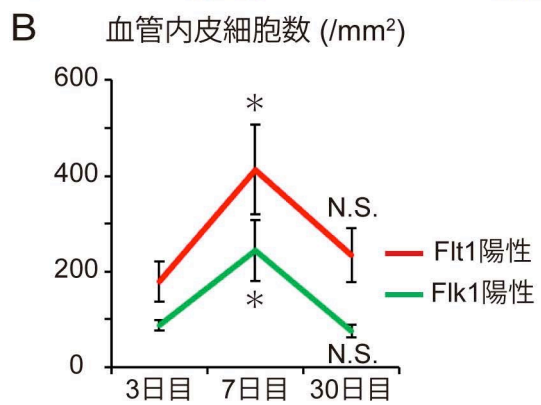
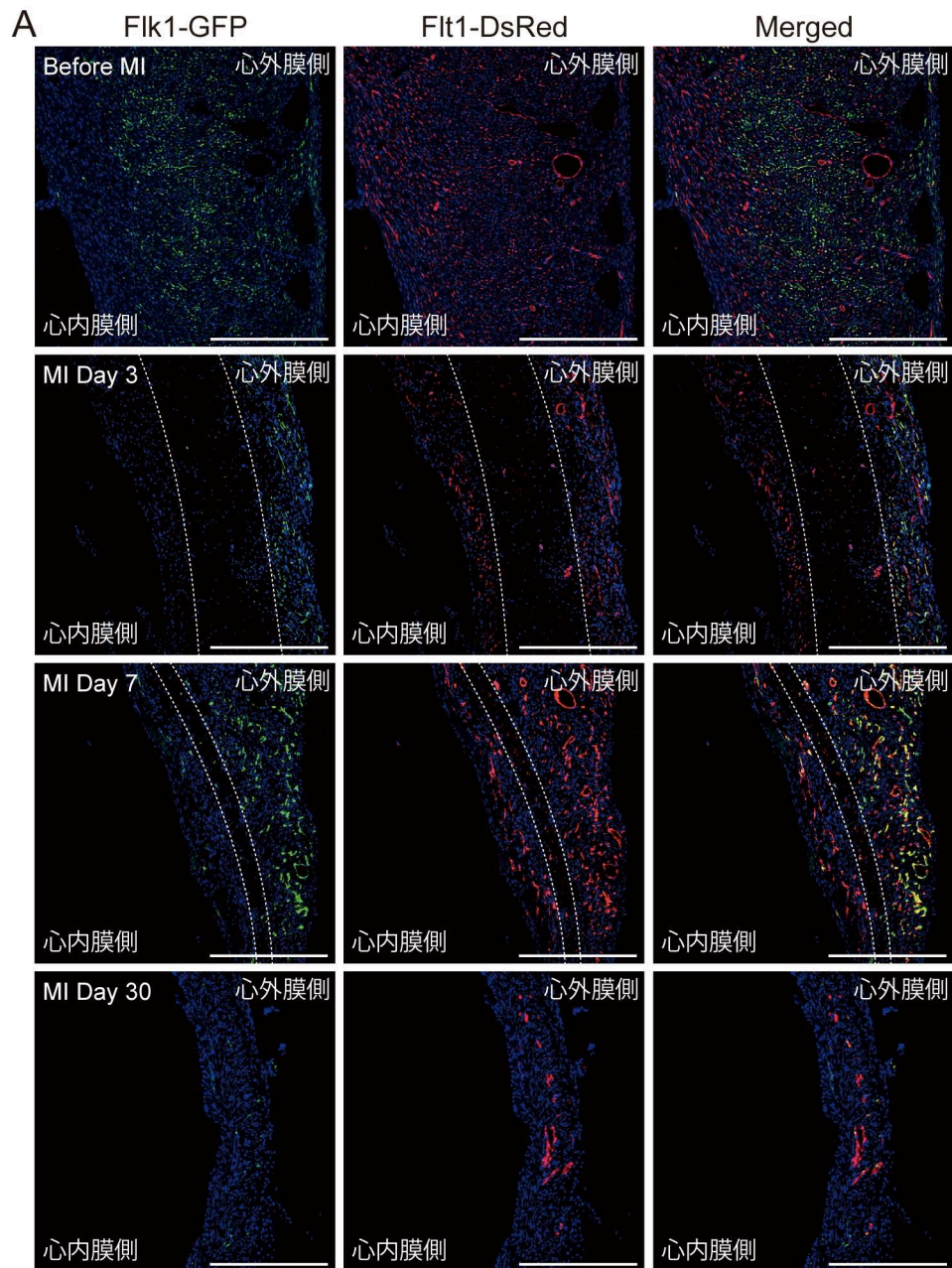


Fig. 16 心筋梗塞後の心臓における Flk1・Flt1 の発現

(A) 心筋梗塞前、心筋梗塞後 3 日目、7 日目、30 日目の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスの心臓の梗塞巣を示した。白点線内は無細胞領域を示している。Flk1-GFP 陽性血管内皮細胞が心外膜側から血管新生を起こし、無細胞領域の縮小が観察された。

(B) 梗塞巣における単位面積あたりの血管内皮細胞数を示した ($n = 3$)。心筋梗塞後 7 日目にかけて一過性の血管新生が観察された。

MI：心筋梗塞。データはすべて平均値 \pm 標準誤差で示し、*は心筋梗塞後 3 日目に対して有意 ($P < 0.05$) であることを示し、N.S.は有意差がないことを示している。スケールバーは、500 μm を示している。

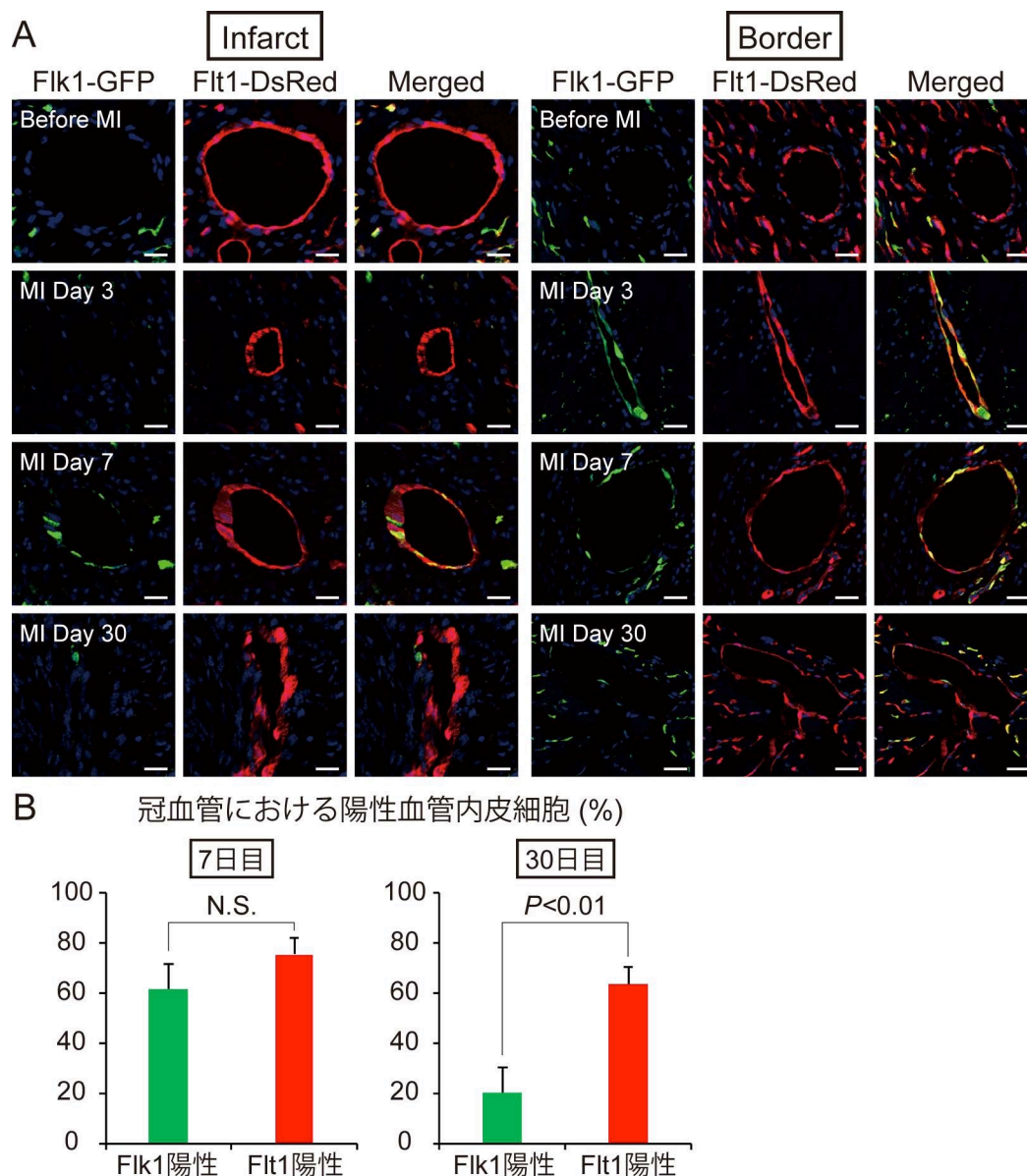


Fig. 17 心筋梗塞後の心臓における Flk1・Flt1 の発現

(A) 心筋梗塞前、心筋梗塞後 3 日目、7 日目、30 日目の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスの心臓の冠血管を示した。左は梗塞巣 (infarct) の冠血管を示している。右は正常巣と梗塞巣の境界部 (border) の冠血管を示している。心筋梗塞後 3 日目から境界部の Flk1-GFP が活性化され、心筋梗塞後 7 日目、梗塞巣の冠血管において Flk1 が活性化された。

(B) 冠血管における Flk1-GFP 陽性もしくは Flt1-DsRed 陽性細胞の割合を示した ($n = 3$)。冠血管において一過性の Flk1 の活性化が観察された。

MI: 心筋梗塞。データはすべて平均値 \pm 標準誤差で示し、N.S. は有意差がないことを示している。スケールバーは、30 μm を示している。

第5章 考察

第1節 出生後の冠血管形成の最近の知見

胎児期の心室壁は小柱層 (trabecular layer) と緻密層 (compact layer) から構成される。

小柱層では心筋細胞が小柱状に積み重なり、心腔の血液からの受動拡散によって酸素と栄養が供給されるため、血管網は形成されない。一方、緻密層では心臓の成長とともに心筋層が肥厚するため、心筋が虚血状態になる。低酸素状態にさらされた心筋細胞では低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor ; HIF) が誘導される。HIF は、VEGF の産生を促進することが知られており、この刺激によって血管形成が活性化される¹³。これまでに E16.5 において緻密層で Flk1 が活性化することを見出しており、この時期の緻密層における活発な血管新生を観察できる (Data not shown)。

出生後、心室壁では緻密化 (compaction) と呼ばれる現象が観察される。これは小柱同士が融合することで、緻密層を形成する現象である。出生後、好気呼吸を開始すると全身の臓器からの酸素要求が高まり、心臓への負荷が高まる。心筋層を短期間で肥厚させ、心機能を高めるためには、緻密化が最も効率の良いメカニズムであると考えられる。一方、緻密化を起こすと心筋層への受動拡散による酸素や栄養の供給が困難になるため、心内膜側においても血管網の形成が必要となる。近年、小柱層における血管形成のモデ

ルが提唱された (Fig. 18) ¹⁷。それは、緻密化によって小柱が隣の小柱と結合する際に間隙が生じ、この間隙が冠血管に分化するというものである。Tian らは、この分子メカニズムとして VEGF シグナルを挙げている。胎児期の血管形成と同様に、緻密化の際、心筋層の酸素濃度が低下することで、VEGF が誘導され、Flk1 シグナルが活性化するというものである。しかしこれは、私が見出した心外膜側に局在する Flk1 の発現パターンとはそぐわない。これに関しては、次節で詳細に考察する。

心内膜側の冠血管形成モデル

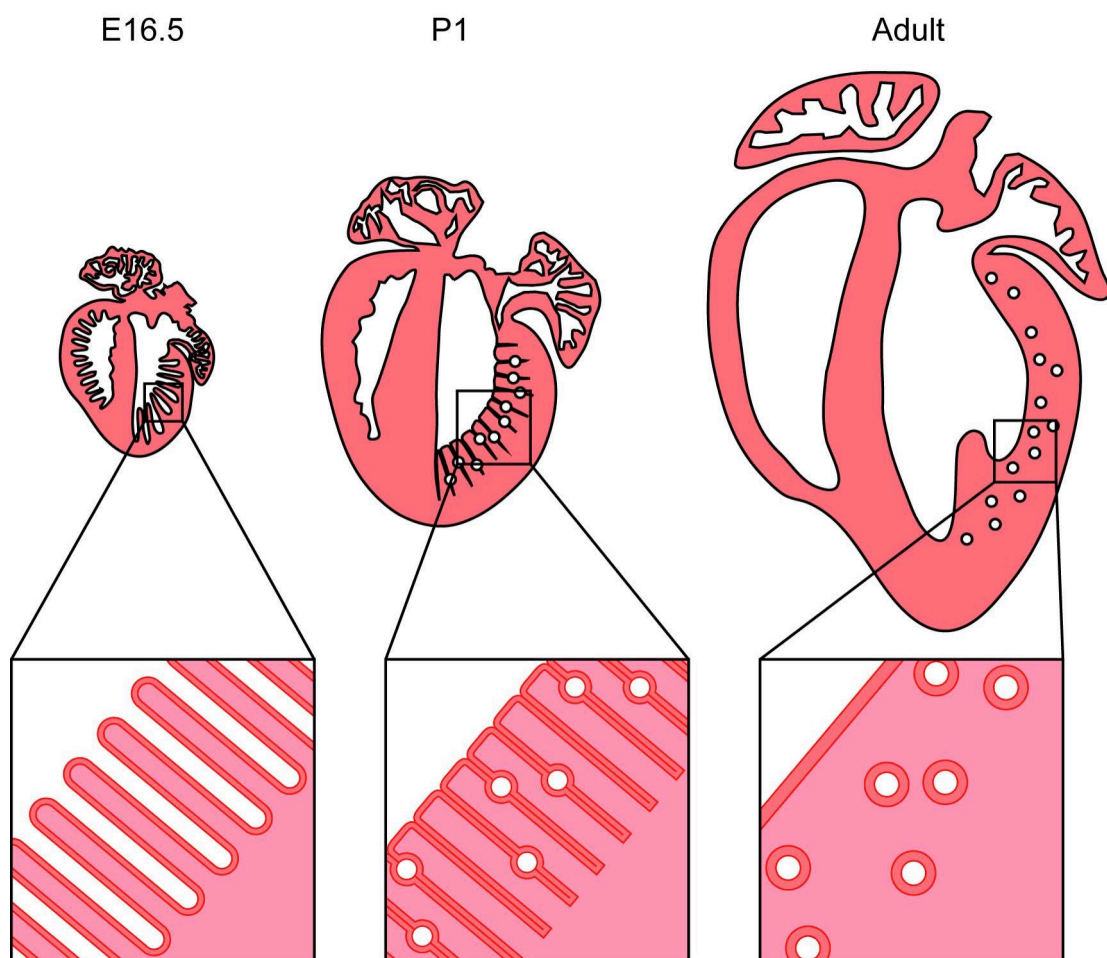


Fig. 18 心内膜側の冠血管形成のモデル

出生後、小柱同士が融合し、急速に心筋層が肥厚する。その際に生じた間隙がその後冠血管へと分化し、心内膜側の冠血管が形成されるモデルが提唱されている。

第2節 出生後の冠血管形成メカニズムの仮説

心室壁の緻密化は、生後の生命活動を維持する上で重要である。また小柱層の冠血管形成は、本研究で用いたトランスジェニックマウスにおいても前節で示したモデルと同様の現象を観察した。一方、前節で述べた心内膜側の冠血管形成の分子メカニズムは、私が見出した Flk1 と Flt1 の発現パターンとは異なっていた。本研究で用いた出生後 1 日目の Flk1-GFP/Flt1-DsRed ダブルトランスジェニックマウスでは、緻密化を起こした心内膜側の冠血管に Flk1 は発現しないが、Flk1-LacZ ノックインマウスを詳細に観察した結果、心内膜の内皮において連続的な Flk1-LacZ 弱陽性細胞が存在することがわかった (Fig. 9A)。この発現の相違の理由として、Flk1-GFP は BAC トランスジェニックマウスであり、ノックインマウスと一部発現が異なる可能性などが考えられる。一方、Flt1-DsRed BAC トランスジェニックマウスを用いた解析から、Flt1 は心内膜の内皮には断続的に発現することがわかった (Fig. 12A)。Flk1 は細胞接着因子を誘導することで血管内皮細胞同士の接着も制御するため、心内膜同士の接着も促進する可能性が考えられる。一方、既述の通り Flt1 は Flk1 の抑制因子として働く。すなわち、連続的な Flk1 の発現が心内膜の融合を促進し、Flt1 が強く発現する部分では Flk1 の働きが抑制されることで、間隙が生じるという仮説が考えられる。このメカニズムならば、短期間で血

管を形成でき、Flt1 が間隙を血管として維持することができる。

第3節 心血管再生医療の現状

心筋梗塞モデルマウスを用いた解析では、梗塞後7日目にかけて一過性の血管新生を認めた (Fig. 16、17)。この時、梗塞巣では心筋細胞は壊死しているため、梗塞巣での VEGF 産生は、急性期の炎症によって活性化されたマクロファージなどの炎症性細胞によるものが大きいと考えられる¹⁸。実際に VEGF の発現は心筋梗塞後数時間以内に一過性に活性化されることが報告されている。そのため炎症が惹起されている急性期 (7日目まで) では活発な血管新生が起こるが、炎症が収まった慢性期 (7日目以降) では血管新生が観察されなかったと考えられる。また私は、慢性期にかけて起こる新生血管の消失に着目した。正常心臓の発生過程では、心筋梗塞後のように一過性に大量の血管を新生し、その後血管を消失させるような現象は観察されなかった。すなわち血管の消失は心筋梗塞特異的な現象であると考えられる。正常な心臓では、心筋細胞が恒常的に VEGF を産生しており、この VEGF シグナルが血管内皮細胞の生存や血管構造の維持に重要であると考えられる¹。

近年、VEGF を用いた心血管再生療法の臨床試験が行われているが、いずれの試験においても有意な治療効果は得られていない^{19,20}。その原因として、血管新生が一過性に終わってしまうこと、新生した血管は脆く、正常に機能しないことなどが挙げられる。

したがって、心血管再生医療を実現するためには、VEGF が働く Flk1・Flt1 の発現を理解し、その機能を制御する必要がある。本研究はこの点で非常に有意義で先駆的な研究と言える。血管再生に加え、心筋再生では近年、iPS 細胞から誘導した心筋細胞の移植が注目を集めており、多くのグループから研究成果が報告されている。しかし、iPS 心筋は製造コストや作製期間の面で課題が多く、さらに未分化細胞の混入はがん化の危険性を孕んでいる。そこで我々は、心筋リプログラミングという方法を用いた新たな心臓再生療法を推進している (Fig. 19)²¹。心筋リプログラミングとは、線維芽細胞を心筋細胞に iPS 細胞を介さずに直接転換する手法である。これまでに心臓特異的な 3 つの転写因子 (Gata4、Mef2c、Tbx5) が線維芽細胞を直接心筋細胞に分化転換する、心筋リプログラミング因子であることを発見し、心筋梗塞モデルマウスにおいて心筋リプログラミングによる心臓再生に成功している。心筋梗塞巣では線維芽細胞が増殖するため、心筋リプログラミングは抗線維化と心臓再生を同時に行える画期的な治療法であり、かつコストや時間の問題をクリアでき、がん化の心配もない。他グループによる報告では、Gata4、Mef2c、Tbx5 に加え VEGF を遺伝子導入することにより、VEGF 単独治療と比べ血管新生が優位に促進し、かつ心機能が改善することが、動物モデルで示されている²²。将来、冠血管と心筋再生という異なる 2 つのターゲットの併用が実現すれば、障害

後の心臓をより生理的環境に近づける画期的な心臓再生療法となることが期待できる。

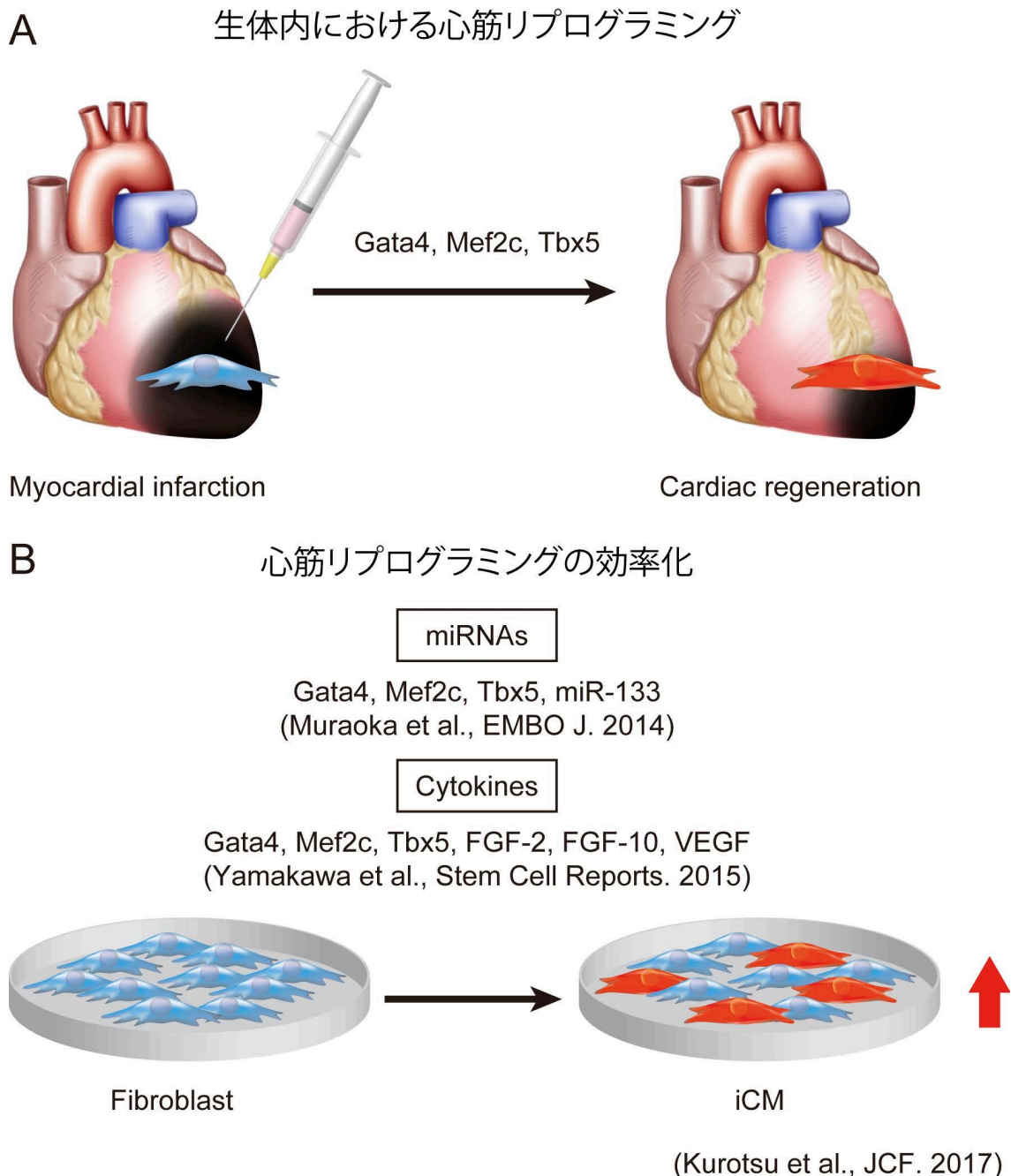


Fig. 19 生体内における心筋リプログラミングと心筋リプログラミングの効率化

(A) 心臓再生の新たなアプローチとして注目されている心筋リプログラミングの模式図を示した。これまでに線維芽細胞を心筋細胞に直接分化転換する心筋リプログラミング因子

(Gata4、Mef2c、Tbx5)を発見し、心筋梗塞モデルマウスにおいて心臓再生に成功している。

(B) 心筋リプログラミングの効率化が試みられている。これまでに心臓特異的な micro RNA (miR-133) や心臓発生に重要なサイトカイン (FGF-2、FGF-10、VEGF) によって心筋リプログラミングが効率化されることが報告されている。

(出典 : Kurotsu et al., JCF. 2017)

第 6 章 結論

心臓の機能を維持する上で、冠血管形成は心臓発生及び病態において重要である。これまで血管形成における VEGF の役割は広範囲に渡って研究されてきたが、その受容体である Flk1 と Flt1 の発現パターンや機能は十分解析されていない。その理由は、免疫染色に適切な Flk1 と Flt1 の抗体が存在しないためである。本研究では Flk1 及び Flt1 の新しいレポーターマウスを使用することによって、冠血管における時空間的な発現パターンの解析に成功し、Flk1 が心外膜側に優位に発現し、Flt1 は心臓全体に一様に発現するという特徴的な発現パターンを世界で初めて見出した。さらに心筋梗塞を起こすと、Flk1 の発現が低下した成体の冠血管においても一過性に Flk1 の発現が上昇し、血管新生が促進されることがわかった。一方、Flt1 は急性期から慢性期にかけて血管に強く発現することで、血管の機能を維持することがわかった。この研究成果は、出生後と心筋梗塞後の心臓内血管新生において Flk1 と Flt1 が時空間的に異なる発現パターンを示すことを解明した最初の研究である。

出生後、心筋細胞の増殖と肥大が起こり、心機能が向上する。その過程で冠血管は心筋へ酸素と栄養を供給するために発達するが、どのようなシグナルが出生後の血管新生を制御するかは明らかにされていなかった。出生後 1 日目の心臓において、Flk1 は冠血

管に強く発現したが、成体の血管新生が休止した冠血管ではその発現が低下していた。

一方、Flt1 は出生後に心臓全体の血管内皮細胞で発現し、この発現パターンは成体においても維持された。以上の結果から Flk1 は血管新生に関与し、Flt1 は血管の成熟と機能の維持に関与すると考えられる。以上のように、冠血管発生の制御のためには Flk1 と Flt1 のバランスが重要であることが示唆された。

血管新生と血管の成熟は心筋梗塞後の治癒過程において重要である。心筋梗塞後、VEGF は数時間の内に発現が上昇し、一過性に血管新生を促進することが報告されている⁴。梗塞巣が治癒するにつれて、新生血管は血管平滑筋や壁細胞に覆われるが、これらの細胞に被覆されない新生血管はアポトーシスを起こす。一方、被覆された新生血管では新生能力が低下するものの、成熟が進む。梗塞巣の治癒過程に関する報告は多いが、梗塞巣での血管新生がどのように制御されるかはこれまで明らかにされていなかった。

本研究で私は、心筋梗塞後 3 日目から 7 日目にかけて、梗塞巣の血管内皮細胞で Flk1 の発現が一過性に上昇し、血管新生が活性化されることを見出した。一方、Flt1 は心筋梗塞後 3 日目の急性期から 30 日目の慢性期まで残存血管及び新生血管に強く発現していた。興味深いことに、この心筋梗塞後の時空間的な Flk1 と Flt1 の発現パターンは、出生後の血管形成における発現パターンを再現していた。

本研究成果は心臓の血管新生、成熟における Flk1 と Flt1 シグナルの重要性を示唆するものであり、本研究によって解明された冠血管形成の分子メカニズムは、虚血性心疾患に対する新規治療法開発の礎となる。

謝辞

本論文を作成するにあたり、ご指導を頂いた慶應義塾大学薬学部・金澤秀子先生、杉本芳一先生に感謝致します。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた慶應義塾大学薬学部・鈴木岳之先生、並びに薬学教育研究センターの皆様に感謝致します。そして、研究方針や実験技術のご指導を頂いた慶應義塾大学医学部・家田真樹先生、並びに家田研究室の皆様に感謝致します。

また本研究は以下の助成を受けて行いました。記して御礼申し上げます。

- ・ 日本薬学会 長井記念薬学研究奨励金
- ・ 慶應義塾大学 博士課程学生研究支援プログラム
- ・ 日本学術振興会 特別研究員奨励費

文献

- 1 Giordano, F. J. *et al.* A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5780-5785, doi:10.1073/pnas.091415198 (2001).
- 2 Frangogiannis, N. G. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* **110**, 159-173, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243162 (2012).
- 3 Tomanek, R. J., Ratajska, A., Kitten, G. T., Yue, X. & Sandra, A. Vascular endothelial growth factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Dyn* **215**, 54-61, doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199905)215:1<54::AID-DVDY6>3.0.CO;2-0 (1999).
- 4 Li, J. *et al.* VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* **270**, H1803-1811 (1996).
- 5 Zhao, T., Zhao, W., Chen, Y., Ahokas, R. A. & Sun, Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A: role on cardiac angiogenesis following myocardial infarction. *Microvasc Res* **80**, 188-194, doi:10.1016/j.mvr.2010.03.014 (2010).
- 6 Tian, X., Pu, W. T. & Zhou, B. Cellular origin and developmental program of coronary

- angiogenesis. *Circ Res* **116**, 515-530, doi:10.1161/circresaha.116.305097 (2015).
- 7 Sharma, B., Chang, A. & Red-Horse, K. Coronary Artery Development: Progenitor Cells and Differentiation Pathways. *Annu Rev Physiol* **79**, 1-19, doi:10.1146/annurev-physiol-022516-033953 (2017).
 - 8 Simons, M., Gordon, E. & Claesson-Welsh, L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 611-625, doi:10.1038/nrm.2016.87 (2016).
 - 9 Shalaby, F. *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-66, doi:10.1038/376062a0 (1995).
 - 10 Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M. & Peng, J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* **126**, 3015-3025 (1999).
 - 11 Red-Horse, K., Ueno, H., Weissman, I. L. & Krasnow, M. A. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* **464**, 549-553, doi:10.1038/nature08873 (2010).
 - 12 Tian, X. *et al.* Subepicardial endothelial cells invade the embryonic ventricle wall to

- p>form coronary arteries.
- Cell Res*
- 23**
- , 1075-1090, doi:10.1038/cr.2013.83 (2013).
- 13 Wu, B. *et al.* Endocardial cells form the coronary arteries by angiogenesis through myocardial-endocardial VEGF signaling. *Cell* **151**, 1083-1096, doi:10.1016/j.cell.2012.10.023 (2012).
- 14 Matsumoto, K. *et al.* Study of normal and pathological blood vessel morphogenesis in Flt1-tdsRed BAC Tg mice. *Genesis* **50**, 561-571, doi:10.1002/dvg.22031 (2012).
- 15 Ishitobi, H. *et al.* Flk1-GFP BAC Tg mice: an animal model for the study of blood vessel development. *Exp Anim* **59**, 615-622 (2010).
- 16 Inagawa, K. *et al.* Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ Res* **111**, 1147-1156, doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.271148 (2012).
- 17 Tian, X. *et al.* Vessel formation. De novo formation of a distinct coronary vascular population in neonatal heart. *Science* **345**, 90-94, doi:10.1126/science.1251487 (2014).
- 18 Stockmann, C. *et al.* A wound size-dependent effect of myeloid cell-derived vascular endothelial growth factor on wound healing. *J Invest Dermatol* **131**, 797-801, doi:10.1038/jid.2010.345 (2011).

- 19 Hedman, M. *et al.* Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation* **107**, 2677-2683, doi:10.1161/01.CIR.0000070540.80780.92 (2003).
- 20 Henry, T. D. *et al.* The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* **107**, 1359-1365 (2003).
- 21 Kurotsu, S., Suzuki, T. & Ieda, M. Direct Reprogramming, Epigenetics, and Cardiac Regeneration. *J Card Fail* **23**, 552-557, doi:10.1016/j.cardfail.2017.05.009 (2017).
- 22 Mathison, M. *et al.* In vivo cardiac cellular reprogramming efficacy is enhanced by angiogenic preconditioning of the infarcted myocardium with vascular endothelial growth factor. *J Am Heart Assoc* **1**, e005652, doi:10.1161/JAHA.112.005652 (2012).